

1 MHz 超音波による OH ラジカル生成と HeLa 細胞への影響

志田 裕美 平岡 和佳子 崔 博坤[†]

明治大学理工学部 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

E-mail: [†]pkchoi@isc.meiji.ac.jp

あらまし 1 MHz 超音波による細胞内での OH ラジカル生成と付着性がん細胞 HeLa への影響について調べた。まず、連続波と Duty 比 1:10 のパースト波において、リン酸緩衝食塩水内の細胞が剥がれることについて調べた。連続波では、空気飽和食塩水で 0.26 MPa、脱気食塩水で 0.56 MPa 以上で細胞が剥がれることが分かった。これらの違いを OH ラジカル生成量に注目して KI 定量法で調べたところ、空気飽和と脱気食塩水での OH ラジカル生成量に大きな違いはみられなかった。これは、OH ラジカルが細胞を剥がす主な原因ではないことを示している。また、細胞を剥がす原因として、固体境界面に存在する気泡によって発生するジェット流による衝撃の影響が考えられる。次に、HeLa 細胞内での OH ラジカル生成を調べるために、OH ラジカルと反応することで 488 nm で励起し、515 nm の蛍光を出す aminophenyl fluorescein を細胞に導入し、蛍光顕微鏡観察を試みた。その結果、脱気食塩水内で 0.56 MPa の連続波照射により蛍光を観察することが出来た。今後は細胞内で OH ラジカルが生成されているかより詳しく検討する必要がある。

キーワード 蛍光, aminophenyl fluorescein(蛍光試薬), HeLa 細胞, OH ラジカル, 超音波

Effect of OH radicals induced by 1 MHz-ultrasound on HeLa cells

Hiromi SHIDA Wakako HIRAOKA and Pak-Kon CHOI[†]

Department of Physics, School of Science and Technology, Meiji University

1-1-1 Higashimita, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 214-8571 Japan

E-mail: [†]pkchoi@isc.meiji.ac.jp

Abstract We investigated the effects of ultrasound at the frequency of 1 MHz on the adhesive property of HeLa cells which are typical cancer cells, and on the production of hydroxyl radicals in the HeLa cells. These cells are suitable for observation under microscope since they easily adhere to petri dish. The limiting amplitudes of ultrasonic pressure over which the cells were detached were determined in a continuous-wave mode and pulsed-wave mode with the duty ratio of 1:10 in phosphate buffered saline solution. In the case of continuous-wave mode, the cells were detached above the pressure of 0.26 MPa and 0.56 MPa in the air-saturated solution and in the degassed solution, respectively. To examine this difference in the limiting pressure amplitude, we evaluated the production of hydroxyl radicals by KI colorimetric procedure. The quantities of the hydroxyl radicals in the degassed solution and in the air-saturated solution were approximately equal. This result indicates that hydroxyl radicals are not the major cause of the cell detachment. The number of cavitation bubbles is considerably large in air-saturated solution and bubbles existing near solid boundary may produce jet impact to the cells.

To study the production of hydroxyl radicals in HeLa cells, we employed aminophenyl fluorescein which reacts with hydroxyl radicals and emits light of 515 nm after exciting with light of 488 nm. We observed fluorescence from the cells under microscope after the ultrasound at the pressure of 0.56 MPa was irradiated in degassed solution. If the fluorescence comes from inside of the cells, we can say that hydroxyl radicals are produced inside of the cells. However, we need to check that the fluorescence does not come from the surface of the cells where aminophenyl fluorescein may be adsorbed.

Keyword fluorescence, aminophenyl fluorescein, HeLa cells, hydroxyl radicals, ultrasound

1. はじめに

超音波は医用診断手法として必須となっているが、最近では温熱治療や薬物効果の促進など、治療法としての超音波利用が期待されている。しかし、超音波は低侵襲でありながら、生体組織や細胞などにダメージを与えることも知られている。[1-4]将来、超音波による治療法を確立するためにはより多くの基礎実験が必要不可欠である。

本研究では、臨床で使われることが多い高周波の超音波による培養細胞への影響について、基礎的な研究を行った。超音波出力を変えながら、付着性のヒト子宮頸部癌細胞 HeLa に超音波を照射したときの細胞への影響、ならびに活性酸素検出用蛍光試薬を細胞へ導入したときの蛍光顕微鏡観察の結果について報告する。[5-7]

2. 実験

2.1. 細胞の付着性観察

HeLa 細胞を培養したプラスチックシャーレ (φ 60 mm) をリン酸緩衝食塩水 25 ml で満たし、斜め上方約 15 mm から 1 MHz 超音波を入射した。振動子への印加電圧は 20 Vpp から開始し、100 Vpp まで 1 Vpp ずつ 10 秒間隔で上げていく。その様子を顕微鏡(Axiovert 35)で観察した。連続波とバースト波(Duty ratio 1:10)、空気飽和食塩水と脱気食塩水など、実験条件を変えて観察を行った。

音圧校正は ONDA1310 ハイドロホンを用いて行った。

2.2. 細胞の生死への影響

超音波によってシャーレ底面から剥がれた細胞の生死を調べた。付着性細胞を培養する際に、細胞を剥がすために一般的に使われる試薬 (Trypsin EDTA) を用いて HeLa 細胞を剥がす場合と、空気飽和食塩水中で連続波 0.26 MPa を 10 秒間照射して剥がした場合とで生死の違いを比べた。また、フローサイトメーターを用いて細胞の大きさと細胞内部構造の違いから細胞の生死を判定した。更に、Annexin V-FITC (細胞膜が変化すると緑色蛍光を発する蛍光試薬) と PI (細胞膜が破れることで細胞内部に入り込み DNA と結合し赤色蛍光を発する蛍光試薬。正常な生細胞膜を透過することが出来ないため、死細胞判定にしばしば使用される) で細胞を二重染色し、フローサイトメーターで蛍光強度

を観察した。FITC と PI の蛍光強度変化により、細胞膜への影響を調べた。

2.3. KI によるラジカル定量

超音波照射によって生成する OH ラジカルが細胞を剥がすことに関与しているかどうかを調べた。KI 吸光度法を用いて OH ラジカル生成量から関与を検討する。2.1 と同様の食塩水で 0.1 M の KI 溶液を作成し、空気飽和溶液と脱気溶液を準備する。それぞれ、細胞が剥がれる強度の 0.26 MPa と剥がれない強度の 0.56 MPa で照射した。このとき、355.5 nm に現れる特徴的な I_3^- の光吸収ピークを分光光度計で測定した。照射時間経過に対する I_3^- の光吸収ピークを測定することで、間接的に OH ラジカルの生成量変化を測定できる。

2.4. 蛍光試薬による細胞観察

HeLa 細胞の蛍光観察を、活性酸素検出用蛍光試薬 Aminophenyl Fluorescein (APF) を用いて行った。APF は強い活性をもつ OH ラジカルを他の活性酸素種 (H_2O_2 , O_2^- , NO など) から区別して検出し、蛍光を出す蛍光試薬である。まず、空気飽和リン酸緩衝食塩水で 15 倍希釈した APF を連続波で 10 秒間照射した。そして、蛍光分光光度計で超音波強度に対する蛍光スペクトルを得ることで、超音波由来のラジカルを検出できるかを調べた。

次に、35 mm φ ディッシュに培養した細胞を、同様の食塩水で 100 倍希釈した APF に 60 分間浸す。細胞を丁寧に同様の食塩水で洗ったあと、4 ml の脱気食塩水で満たす。顕微鏡で超音波照射前後の蛍光観察を行い、細胞内で OH ラジカルができていないかを調べた。

3. 結果

3.1. 細胞の付着性観察結果

顕微鏡による細胞観察の結果、計測した HeLa 細胞の大きさは 19 から 72 μm で、平均 $45.5 \pm 26.5 \mu m$ であった。細胞数は $1.4 - 1.8 \times 10^3$ 個/ mm^2 であった。また、超音波照射により細胞剥がれが観察された。バースト波照射による細胞剥がれの結果を Fig.1 に示す。横軸は Duty 比を 1:10 固定にしたときの ON 時間である。空気飽和食塩水中への超音波照射では、連続波で 0.26 MPa 以上で細胞が剥がれ、バースト波で ON 時間 75 μs (50 波) 以上から約 0.35 MPa 以上で剥がれ

た。このことから、バースト波はON時間 $75 \mu s$ 以上で連続波の約 1.4 倍の音圧であれば、細胞を剥がすことに関して連続波と同等の効果を示すことが分かる。また、脱気食塩水中への超音波照射では 0.56 MPa でも細胞剥がれは起こらなかった。

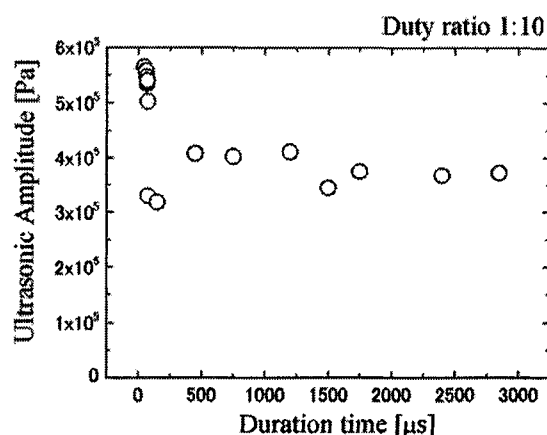


Fig.1 Threshold amplitude of detachment of HeLa cells as a function of ultrasonic duration time at 1 MHz. Duty ratio was fixed to 1:10.

3.2. 細胞の生死への影響について

Trypsin EDTA 処理と超音波処理によって剥がれた細胞の生死割合をフローサイトメーターによって調べた結果を Fig.2,3 に示す。Trypsin EDTA 処理の場合、測定開始直後の生細胞は約 9 割を占め、時間経過とともに生細胞率は下がった。2 時間後には生細胞の割合が約 6 割まで下がった。一方、超音波照射した細胞は、測定開始直後で死細胞が約 9 割を占め、その後時間経過に伴う変化はみられなかった。

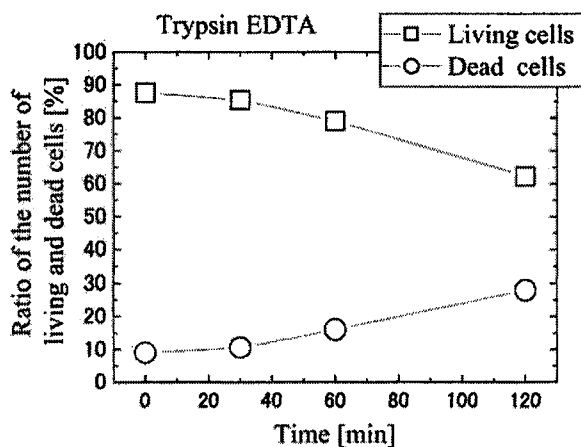


Fig.2 Ratio of the number of living and dead cells treated with Trypsin EDTA.

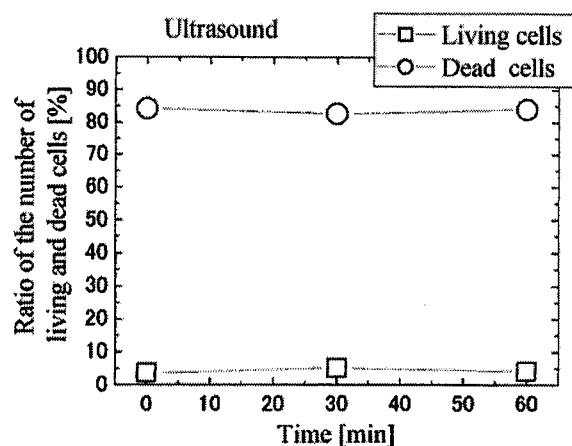


Fig.3 Ratio of the number of living and dead cells treated by Ultrasound. Continuous waves at 0.26 MPa were irradiated.

これは、超音波照射によって剥がれた細胞がダメージを受けていることを示唆している。したがって、超音波によって剥がれることは細胞が死ぬこととほぼ同等であるといえる。

また、AnnexinV-FITC と PI の蛍光強度と細胞数について Fig.4 と 5 にそれぞれ示す。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数を表す。グラフより、超音波処理した場合の方が、死細胞における蛍光強度がそれぞれ著しく増加していることが確認できた。FITC の蛍光強度増加は細胞死の初期段階である細胞膜の部分的な変化を示し、PI の蛍光強度増加は細胞膜が破れていることを示す。また、細胞の形状変化から求めた生死判定は、AnnexinV-FITC と PI の蛍光増強と一致していることから、細胞膜が破断して細胞の形状が変化し細胞が死に至ることが分かった。

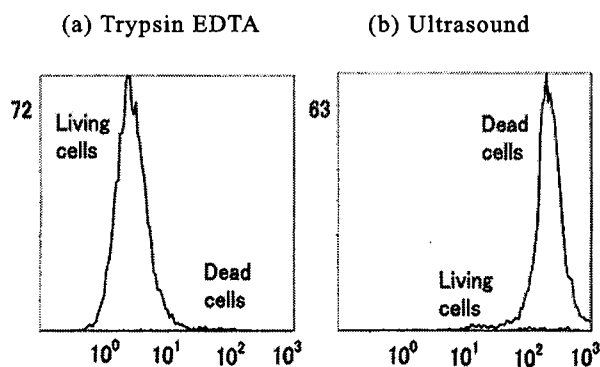


Fig.4 FITC fluorescence intensities at 530 nm (Excitation wavelength is 488 nm) for HeLa cells treated by Trypsin EDTA(a) and 1 MHz-ultrasound(b).

(a) Trypsin EDTA

(b) Ultrasound

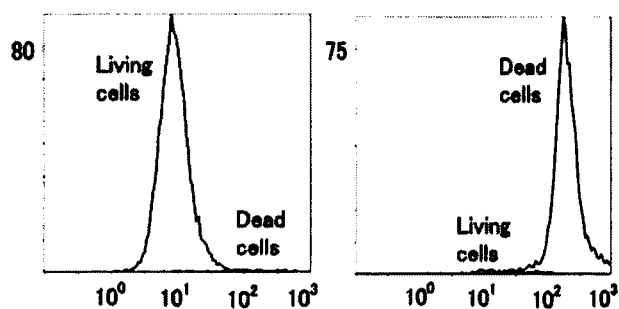


Fig.5 PI fluorescence intensities at 620 nm (Excitation wavelength is 488 nm) for HeLa cells treated by Trypsin EDTA(a) and 1 MHz-ultrasound(b).

3.3. ラジカル定量結果

KI 定量法によるラジカル量測定結果を Fig.6 に示す。空気飽和 KI 溶液に連続波 0.26 MPa を照射した吸光度と、脱気 KI 溶液に連続波 0.56 MPa を照射した吸光度を比較している。ここで、0.26 MPa は空気飽和食塩水に超音波照射したとき細胞が剥がれる条件であり、0.56 MPa は脱気食塩水に超音波照射したとき細胞が剥がれない条件である。どちらの場合も 355.5 nm の吸光度に大きな差は見られないため、ラジカル量に大きな差はないことが分かった。このことから、ラジカルが細胞を剥がす主な原因であるとは考えにくい。ほかの超音波作用として、機械的作用を生むキャビテーション崩壊時の衝撃波とマイクロジェット流が考えられる。特に HeLa 細胞はシャーレ底面に付着しているため、固体境界面に存在している。よって細胞剥がれはマイクロジェット流による影響が大きいと考える。

3.4. 蛍光試薬による細胞観察結果

超音波照射した活性酸素検出用蛍光試薬 APF の規格化した蛍光スペクトルを Fig.7 に示す。超音波照射をしていない control に対して、10 秒間照射すると 0.18 MPa で約 2 倍、0.45 MPa 以上で約 10 倍の蛍光強度が確認できた。これは超音波照射によって生成したラジカルが APF と反応し、蛍光を発したと考えられる。また今回の反応溶液において、0.45 MPa 以上の超音波強度で 10 秒間照射すると反応溶液はほぼ最大蛍光強度を発する。また 0.18 MPa で 30 秒間照射することでも、反応溶液のほぼ最大蛍光強度が観察された。

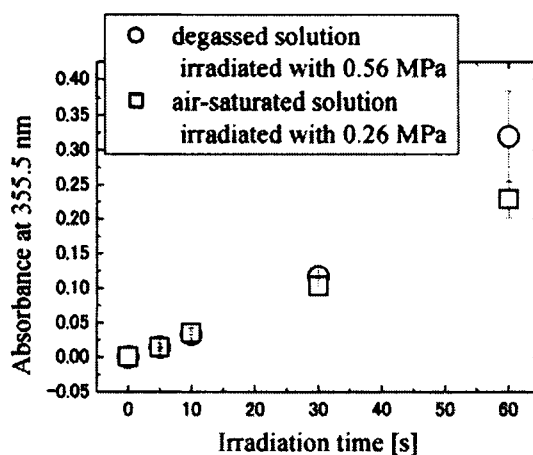


Fig.6 Absorbance of KI_3^- , a measure of production of hydroxyl radicals, as a function of the irradiation time.

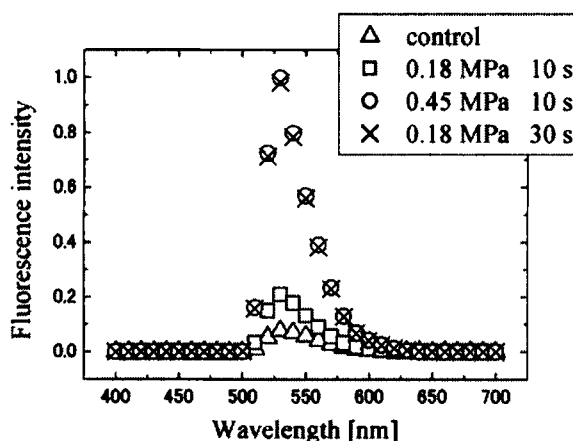


Fig.7 Fluorescence intensity of APF activated by ultrasound at various conditions.

次に、細胞に APF を加えて 0.45 MPa の連続波を 10 秒間照射した後、顕微鏡によって観察した蛍光画像を Fig.8 に示す。上から位相差観察(i)、超音波照射前(ii)と照射後(iii)の蛍光観察である。照射の前(ii)にくらべ、照射後(iii)の蛍光強度が増加しているのが分かる。ここで、蛍光観察や超音波照射をする前に細胞を丁寧に洗っているため、細胞表面に付着している APF は洗い流されているはずである。よって、蛍光は細胞内からのものと考えられる。Fig.8(ii)で、超音波照射前の細胞からもわずかに蛍光が観察されているが、これは Fig.7 の control から明らかなように、超音波処理前の状態ですでに細胞内に入り込んだ APF が弱い蛍光を示すためである。超音波照射後に蛍光が

増加しているのは、超音波照射により細胞内でラジカルが生成したためと考えられる。ただし、蛍光が細胞内から発されているか確認する必要があり、蛍光強度についても更に詳しく検討していく必要がある。

4. まとめ

1 MHz 超音波において、連続波では空気飽和食塩水で 0.26 MPa、脱気食塩水で 0.56 MPa 以上で細胞が剥がれることが分かった。KI 定量法により OH ラジカルが細胞を剥がす主な原因ではないことが考えられ、固体境界面で発生するジェット流が主な原因として考えられる。顕微鏡観察では、OH ラジカルが細胞内で発生したことによる APF の蛍光強度増加は観察できたが、蛍光強度の更なる検討と、試薬が細胞内にあるか確認することが必要である。そして、細胞内で OH ラジカルが生成されていることをさらに確実にしていく必要がある。

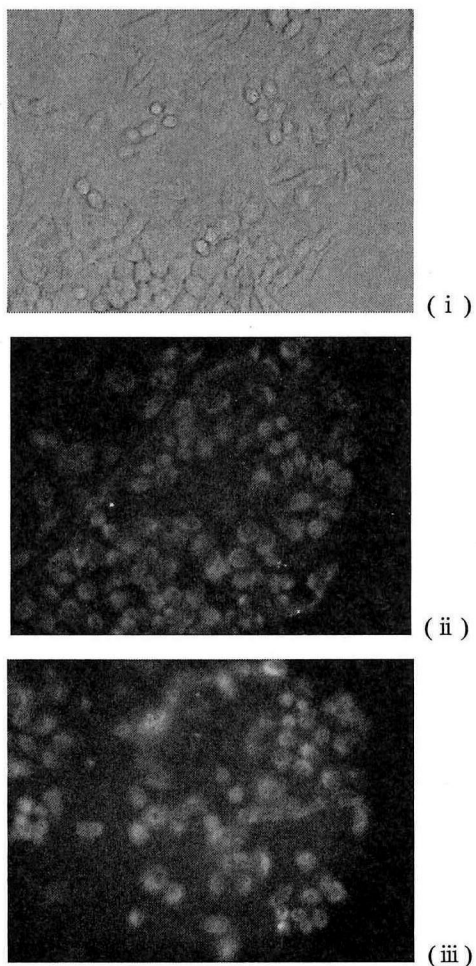


Fig.8 Phase-contrast image (i) and fluorescence images of HeLa cells with aminophenyl fluorescein before (ii) and after (iii) ultrasound irradiation.

文 献

- [1] Miller MW, Miller DL, and Brayman AA, "A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective," *Ultras. in Med. & Biol.*, Vol.22, No.9, pp.1131-54, 1996.
- [2] カウンスタント, 小林正広, 奥島基良, "超音波照射機能付き光学顕微鏡システムを用いた赤血球ダメージの基礎研究," 信学技報, US97-1, 1997.
- [3] Loreto B. Feril, Jr., Takashi Kondo, Yoshiaki Tabuchi, Ryohei Ogawa, Qing-Li Zhao, Tetsuo Nozaki, Toru Yoshida, Nobuki Kudo, and Katsuro Tachibana, "Biomolecular Effects of Low-Intensity Ultrasound: Apoptosis, Sonotransfection, and Gene Expression," *Jpn.J.Appl.Phys.*, Vol.46, No.7B, pp.4435-40, 2007.
- [4] 近藤隆, 趙慶利, 小川良平, 森秀美, 福田茂一, "生体と超音波: キャビテーションによるフリーラジカルの生物作用," 日本音響学会誌, Vol.57, No.5, pp.368-373, 2001.
- [5] Su X. Liu, Mohammad Athar, Istvan Lippai, Charles Waldren, and Tom K. Hei, "Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity," *PNAS*, Vol.98, No.4, pp.1643-8, 2001.
- [6] Suhr D, Brümmer F, Irmer U, Schlachter M, and Hülser DF, "Reduced cavitation-induced cellular damage by the antioxidative effect of vitamin E," *Ultrasonics*, Vol.32, No.4, pp.301-7, 1994.
- [7] Suhr D, Brümmer F, and Hülser DF, "Cavitation-generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell-free solutions and suspended cells," *Ultras. in Med. & Biol.*, Vol.17, No.8, pp.761-8, 1991.